DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.10.023
第25卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 10
892 2003年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)10-0892-03

重组α-病毒的制备和鉴定

黎万玲,倪 兵,吴玉章 (第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨从DNA水平制备重组α-病毒的新途径,寻找更简便的制备重组α-病毒疫苗的新方法。方法 将表达β-半乳糖苷酶的载体和包装载体用磷酸钙法共转染BHK包装细胞,收集并纯化上清中的病毒。再用该病毒在体外感染BHK细胞,鉴定所制备病毒滴度和目的基因的表达情况。结果 用本方法制备出了较高效价的重组病毒,并能在哺乳细胞中很好地表达。结论 从DNA水平可以制备出较高滴度的重组α-病毒,这种方法可以扩展用于基因治疗和疫苗的制备。

关键词:α-病毒;转染;制备
中图法分类号:Q782;R373;R394-33 文献标识码:A

Preparation of recombinant alpha-virus

LI Wan-ling, NI Bing, WU Yu-zhang (Department of Immunology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore a new simpler method for the preparation of recombinant alpha-virus as a novel vaccine at the DNA level. Methods Plasmids expressing β-gal protein and helper plasmids were transfected into BHK cells. Virus in culture supernatant of the transfected BHK cells were collected and purified and used to infect BHK cells *in vitro* to identify the expression of target gene and the titre of the recombinant virus. Results Recombinant virus with high titre, prepared by this method, could be expressed well in mammalian cells *in vitro*. Conclusion High-titre recombinant alpha-virus can be produced at the DNA level and this method can be applied for vaccine preparation and gene therapy.

Key words: α-virus; transfection; preparation

随着基因转移技术的进步,各种新的基因载体不断涌现。α-病毒作为一个新的载体,它操作简便、宿主广泛、胞浆中RNA复制和外源基因表达高效的特性,使其逐渐被人们所认识,并在基因治疗领域里得到广泛的应用[1]。随着各种重组α-病毒载体的出现,使得α-病毒载体更适于人类的基因治疗。但是,国外现有的α-病毒制备方法都是从RNA途径来制备的[2],这种方法虽然有其优越性,但RNA水平的操作十分烦琐。因此,本研究拟利用表达β-半乳糖苷酶(β-gal)的质粒载体,在DNA水平来制备重组α-病毒颗粒,以探讨制备α-病毒的新方法。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

表达β-半乳糖苷酶(β-gal)的质粒载体pSMART2a/LacZ和辅助包装质粒载体helper,为本室合作单位加拿大多伦多大学细胞生物学教研室惠赠;BHK细胞购于ATCC;X-gal购于Sigma公司;其余试剂和材料均购自国内。

1.2 方法

1.2.1 质粒酶切鉴定 对提取的pSMART2a/LacZ质粒用*Xho*Ⅰ和*Bam*HⅠ进行双酶切;对helper质粒用*Xho*Ⅰ和*Xba*Ⅰ进行双酶切鉴定。

1.2.2 质粒大量抽提 参照文献[3]方法进行。

1.2.3 BHK细胞的培养 参照文献[4],按常规方法,用含10% FCS的RPMI 1640完全培养基培养。

1.2.4 磷酸钙法质粒共转染 接种细胞至6 cm平板,细胞长至40%~60%融合时进行转染。在无菌操作台上向质粒DNA溶液中(溶于灭菌TE中,超螺旋>90%)加灭菌水至125 μl,再加125 μl 0.5 mol/L $CaCl_2$(总体积为250 μl)。在无菌操作台上竖放一根灭菌透明玻璃管,加入250 μl 2×HBS及DNA/$CaCl_2$混合液,混匀。放置20 min(会有一点浑浊,这是磷酸钙沉淀)。加混合物于细胞平板中,轻轻摇动混匀,置培养箱中培养。加入DNA 18 h后,PBS洗涤细胞1次,加3 ml新鲜RPMI1640+10% FCS培养基继续培养。

1.2.5 病毒浓缩和纯化 换液24 h后,从已转染的平板中收集培养基,在台式离心机上4 ℃ 2 000 r/min离心15 min。在SW-40或SW-41超离心管中建立蔗糖密度梯度,下层为1 ml 55%蔗糖(于TNE中),上层为3 ml 20%蔗糖(于TNE中)。将干净的培养基置于梯度的顶部至超速离心管接近满管。4 ℃ 30 000 r/min离心90 min,将病毒颗粒离心至55%的蔗糖层中。吸弃含培养基的顶层部分,再用一个薄壁吸管从上面吸取离心管底部含病毒颗粒的约1 ml左右的蔗糖溶液。将其分成50~100 μl等份,干冰上速冻后置-80 ℃保存。

1.2.6 X-gal分析 为了确定质粒转染或病毒转染的效率,可在转染平板上进行X-gal分析:①用PBS洗涤平板2次;②向

作者简介:黎万玲(1974-),女,四川省开江县人,助理实验师,主要从事医学免疫学和分子生物学方面的实验研究。电话:(023)68752238-617

收稿日期:2002-12-15;修回日期:2003-04-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

6 孔平板中加入 2 ml 0.2%戊二醛 PBS 溶液, 4 ℃孵育 15 min 或过夜均可; ③去掉固定剂, 用 PBS 洗涤平板 2 次; ④用至少 1.5 ml 新鲜配制的 X-gal 染液覆盖细胞, 37 ℃温育几小时或过夜, 注意普通光镜下观察细胞颜色的变化(暗蓝色)。

1.2.7　重组病毒表达鉴定

1.2.7.1　准备细胞　　感染前 1 d, 在 6 孔平板的每一孔中接种入 4×10^5 BHK 细胞, 使培养细胞长至 40%融合。

1.2.7.2　准备用于感染的病毒　　从转染的 6 孔平板中收集所有培养基。于台式离心机上 4℃ 2 000 r/min 离心 5 ~ 10 min, 收集含病毒的培养基。或使用浓缩纯化后的冻存病毒, 将其在 37 ℃速融后使用。向病毒悬液中加入 1/20 体积的 10 mg/ml 的α-糜蛋白酶溶液, 置室温孵育 45 min(通过将 p62 糖蛋白裂解成 E2 和 E3 蛋白以活化病毒)。45 min 后, 加入 1/15 体积的 10 mg/ml 抑肽酶 aprotinin 终止蛋白酶活性, 室温温育 5 min。

1.2.7.3　感染细胞　　从即将感染的平板中倒掉培养基, 用 1×PBS 洗涤; Aprotinin 温育结束后, 取出适当数量的活化病毒, 分别加到 6 孔培养平板中, 并用无血清培养基补充至 500 μl。如果感染期间细胞脱离孔底, 建议感染期间加 2%血清。二氧化碳孵箱培养 45 min。在培养快结束时, 弃含病毒培养基, 用 1×PBS 洗涤, 再加 2 ml 新鲜的 RPMI1640+ 10% HI FCS。

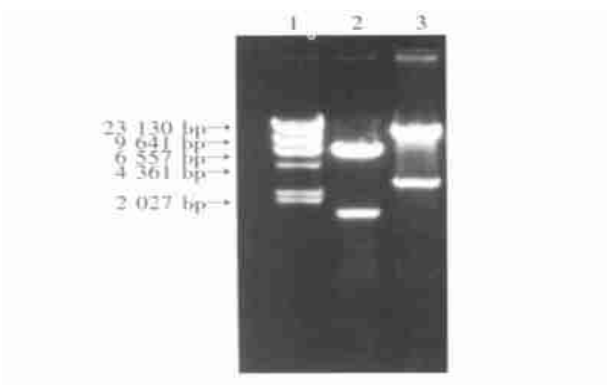
1.2.7.4　X-gal 染色鉴定β-gal 的表达　　感染 18 ~ 24 h 后, 进行 X-gal 分析(见上)以鉴定病毒的感染和目的蛋白的表达。

1.2.8　重组病毒透射电镜观察　　按常规方法进行病毒颗粒悬液的电镜样品制备。

2　结果

2.1　质粒双酶切鉴定结果

在一次反应中对这两种质粒进行双酶切, 结果见图 1。从图中可以看出, pSMART2a/LacZ 质粒经 *Bam*HⅠ和 *Xho*Ⅰ双酶切后, 得到了 12 433 bp 的线性空质粒条带和 3 000 bp 左右的 *LacZ* 目的基因条带。Helper 质粒经 *Xho*Ⅰ和 *Xba*Ⅰ双酶切后得到了与预期值一致的两条带, 分别为 1 698 bp 和 6 952 bp, 共 8 650 bp。



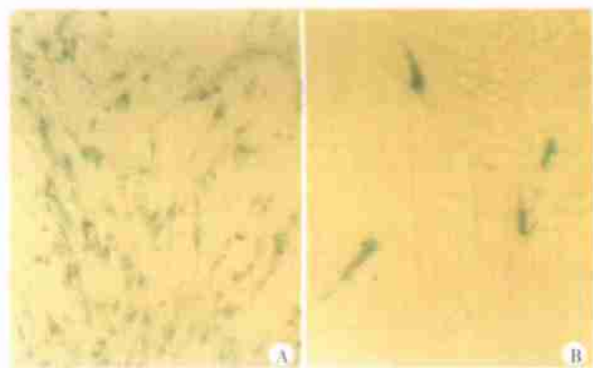
1: λDNA/*Hind*Ⅲ marker; 2: Helper plasmid digested by *Xho*Ⅰ and *Xba*Ⅰ; 3: pSMART2a/LacZ plasmid digested by *Xho*Ⅰ and *BamH*Ⅰ

图 1　质粒 **pSMART2a/LacZ** 和 **Helper** 的双酶切鉴定图

Fig 1　Electrophoresis analysis of enzymatic digestion of pSMART2a/LacZ and helper plasmid

2.2　重组病毒感染哺乳细胞及在其中表达目的基因

重组病毒颗粒感染 BHK 细胞后, 可见 50%以上的细胞被感染, 见图 2A; 而 pSMART2a/LacZ 质粒用磷酸钙法转染时却只有少量的细胞被感染, 见图 2B。提示 SMART2a/LacZ 质粒太大而感染效率不高; 用这种质粒制备成病毒后, 可以使目的基因的转染效率大为增加。



A: LacZ expression in BHK cells after recombinant virus infection; B: LacZ expression in BHK cells after calcium phosphate transfection of pSMART2a/LacZ plasmid

图 2　重组病毒感染和单纯质粒转染后目的基因表达情况的比较　(×40)

Fig 2　Comparison of LacZ expressions in BHK cells transfected with recombinant virus or plasmid only　(×40)

2.3　重组病毒颗粒电镜照片

所制备的重组病毒颗粒悬液经常规样品处理后进行透射电镜观察, 结果见图 3。可见均匀的直径约为 30 nm 的病毒颗粒, 证明病毒颗粒制备成功。

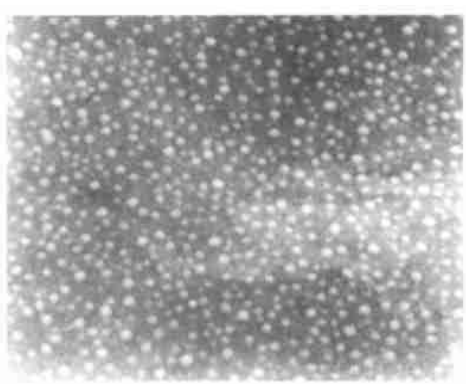


图 3　重组病毒颗粒的透射电镜图　(TEM× 100 000)

Fig 3　Transmission electron microscope analysis of recombinant virus suspension　(TEM× 100 000)

3　讨论

α-病毒是一种(+)链单链 RNA 病毒, 进入宿主胞浆后, (+)链基因组 RNA5′端 2/3 将翻译成 RNA 复制酶, 此酶将在胞浆中催化全长(-)链 RNA 合成; 反之亦然。此酶还催化(-)链 RNA3′端 1/3 合成亚基因组 mR-

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

NA，并由后者翻译成α-病毒结构蛋白。如果以外源基因取代α-病毒结构蛋白基因而与α-病毒复制酶基因融合，将会在胞内产生目的蛋白。α-病毒在一个细胞中的拷贝数理论上可达 2×10^5 个，因此，目的蛋白的拷贝数将会非常高。已有报道利用α-病毒载体或利用含α-病毒的 RNA 复制酶基因的表达载体用于单纯疱疹病毒、Lac-Z 等方面的研究[1]，并取得较常规 pDNA 疫苗如 pCMV 质粒强得多的细胞和体液免疫反应。要达到SFV 质粒 DNA 载体同等量的体液反应，需要的CMV 质粒在 1000 倍以上。本研究所制备的重组 α-病毒质粒是将 α-病毒的调节蛋白（复制酶）和结构蛋白（包膜蛋白和衣壳蛋白）分别构建的两个质粒，即pSMART2a/LacZ 和 helper。前者含复制酶和 LacZ 基因，后者含结构蛋白基因。由于它们是独立的两个质粒，而该病毒的包装信号位于复制酶基因内部，所以在体外包装成病毒颗粒后，其中不再含有结构蛋白基因。当病毒再感染宿主细胞时，虽然此病毒颗粒所包含的复制酶基因在体内翻译后能大量扩增位于复制酶下游的目的蛋白，但由于结构蛋白基因此时已不在病毒颗粒中，所以不会再在宿主体内进行包装成有感染性的病毒颗粒，因此以其作为目的基因载体不仅使得目的基因的表达效率极高，对宿主来说也会非常安全。

在制备该病毒时，我们发现，长满至底面积 40%～60%的单层细胞较之长满至 80%者转染效率高。较低融合度（40%～60%）的细胞比较高者（80%）细胞转染效率高。在 6 cm 平板上，我们在转染的前 1 d 接种 4×10^5 BHK 细胞，如果接种的源平板细胞生长过度即全部长满，这些细胞将生长得很慢，第 2 天，6 cm 平板将只有 40%～50%的汇合。但是，如果源平板的覆盖度是 90%，细胞将生长得好得多，到第 2 天，6 cm 平板将有 50%～60%的汇合。也就是说，如果在转染前 1 d 接种细胞，不要从长满了的源板上接种，这样接种的细胞既长不好也转染不好。源平板至多只能有90%的融合。

当细胞成簇生长、呈蓬松状且有很多触角时，转染效率最好。当接种的细胞小而圆，呈多克隆状时，转染效率会下降。转染前 2 h，PBS 洗涤要转染的细胞，重新置换约 3 ml RPMI1640＋10% HI FCS 培养基。甚至在转染前的数分钟置换培养基，也转染得很好。但是，不能在转染前 1 d 置换培养基，而必须在转染当天置换培养基。

1∶2～4（pSMART2a/LacZ∶Helper）的摩尔比能产生最高滴度的病毒。用磷酸钙方法时，必须至少用 2.5～3.0 μg 的 pSMART2a/LacZ，因为我们发现，当用 2 μg 的pSMART2a/LacZ 时，病毒的产量会下降 100 倍。但 4 μg 以上时，病毒产量也会下降。虽然培养时间超过 24 h 后，病毒的量也会有所增长，但最多并没有超过 24 h 时所收集的两倍。因此，24 h 时收集病毒是合适的。

另外，将收集的病毒颗粒悬液分成小包装保存是必要的，因为反复冻融会大大降低病毒的感染性。将分装的病毒置于 37 ℃融化比在冰上融化的感染效果更好。浓缩和没浓缩的病毒储液可于－80 ℃保存，但是，它们都将损失 2 倍左右的活性。

参考文献：

[1] Lundstrom K, Schweitzer C, Rotmann D, *et al*. Semliki Forest virus vectors: efficient vehicles for *in vitro* and *in vivo* gene delivery[J]. FEBS Lett, 2001, 504(3): 99－103.

[2] Withoff S, Glazenburg K L, van Veen M L, *et al*. Replication-defective recombinant Semliki Forest virus encoding GM-CSF as a vector system for rapid and facile generation of autologous human tumor cell vaccines[J]. Gene Ther, 2001, 8(20): 1515－1523.

[3] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 第 2 版. 北京：中国协和医科大学出版社，1999. 115－120.

[4] 鄂 征. 组织培养和分子细胞学技术[M]. 北京：北京出版社，1995. 121－127.

（编辑 冷怀明）

（上接 889 页）

有大量血块等情况，不难做出诊断。本组 21 例均有上述典型的临床表现，所以术前诊断比较明确。

前列腺增生并发膀胱大出血，常常有不同程度的心、肺、脑、肝、肾功能减退，加上休克等，病人情况危急，对这种情况需紧急处理。本组 21 例病人在明确诊断后，经积极地抗休克、及时补充血容量，使全身组织有良好的血流灌注，防止了并发急性肾功能衰竭。因此，纠正休克是关键。在纠正失血性休克的前提下，尽可能术前判明病人的身体状况，作必要急诊术前准备，急诊行前列腺手术。本组 21 例，9 例行耻骨上经膀胱前列腺摘除术，12 例行TURP，术后恢复均满意。

需要强调的是，通过对本组 21 例病人的诊断治疗，我们认为：对于前列腺增生并发膀胱大出血的病人，应尽早诊断，及时处理。在治疗上，应采取积极的态度。行前列腺摘除术，有条件的医院 TURP 不失为一种较好的手术方法，可明显减少并发症和缩短住院时间。对那些反复血尿者，尤其是大量出血数次的患者，应行手术切除。否则，即使能暂时止血，但由于原发病未予解除，仍有再次出血的可能。

关键词：前列腺；增生；出血
中图法分类号：R697.320.6 文献标识码：B

参考文献：

[1] 吴价平. 泌尿外科[M]. 济南：山东科学技术出版社，1993. 947－948.

[2] 吴阶平，裘法祖. 黄家驷外科学[M]. 第 6 版. 北京：人民卫生出版社，1999. 1702－1710.

（编辑 张大春）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net